

**Untersuchungen
zur Strahlenempfindlichkeit des
malignen Melanoms
des Goldhamsters**

Klaus Engels

1975



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551905_0037

Aus dem Strahlenbiologischen Institut der Universität München

Direktor: Prof. Dr. O. Hug

Untersuchungen
zur Strahlenempfindlichkeit des
malignen Melanoms
des Goldhamsters

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde in der
gesamten Medizin an der Ludwig-Maximilian-Universität,
München.



Vorgelegt von
Klaus Engels
aus
Saig
1975

Mit Genehmigung des Fachbereiches Medizin der Universität
München.

Berichterstatter: Prof. Dr. O. Hug

Mitberichterstatter: Priv.-Doz. Dr. K.-R. Trott

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 19. 12. 1975



Verzeichnis

1. Gedichte

1. Gedichte von Schiller	1
2. Gedichte von Goethe	2
3. Gedichte von Schlegel	3
4. Gedichte von Hegel	4
5. Gedichte von Schopenhauer	5
6. Gedichte von Nietzsche	6
7. Gedichte von Wagner	7
8. Gedichte von Strauss	8
9. Gedichte von Meyer	9
10. Gedichte von Büchner	10

2. Dramen

Meinen Eltern
in Dankbarkeit gewidmet.

3. Romane

1. Romane von Schiller	1
2. Romane von Goethe	2
3. Romane von Schlegel	3
4. Romane von Hegel	4
5. Romane von Schopenhauer	5
6. Romane von Nietzsche	6
7. Romane von Wagner	7
8. Romane von Strauss	8
9. Romane von Meyer	9
10. Romane von Büchner	10

4. Wissenschaftliche Werke

5. Biographien

Gliederung

1)	Einleitung	1.
2)	Material und Methode	2.
a)	Material	
	Tiere	2.1
	Tumor	2.2
b)	Methode	
	Transplantation	2.3
	Herstellung der Zellsuspension	2.4
	Herstellung von Feeder-Zellen	2.5
	Bestrahlung	2.6
	Kontrolle	2.7
	Berechnung der Werte	2.8
3)	Ergebnisse	3.
	Überimpfung unbestrahlter	
	Tumorzellen	3.1
	TD ₅₀ Feeder	3.2
	TD ₅₀ nach Bestrahlung	3.3
	Dosiseffektkurve	3.4
4)	Diskussion	4.
	zur Methode	4.1
	Hewitt	4.1.1
	Feeder	4.1.2
	Sauerstoffeffekt	4.2
	Dosiswirkungsbeziehung	
	im allgemeinen	4.3
	Vergleich mit anderen	
	Tumoren	4.4
	Vergleich mit in vitro	4.5
	Bedeutung für die Praxis	4.6
5)	Zusammenfassung	5.
6)	Literaturverzeichnis	6.

1. Einleitung

Das maligne Melanom gilt allgemein als sehr strahlenresistenter Tumor. Die Ursache wurde in der zellulären Strahlenunempfindlichkeit des Melanoms gesehen.

Bei der Therapie des malignen Melanoms des Menschen wurde die Bestrahlung daher weitgehend zugunsten der chirurgischen Behandlung verlassen.

Mehrere Melanome verschiedener Tierarten sind bekannt. Das Melanom des Hamsters kommt dem menschlichen Melanom relativ nahe.

Um dieses "Dogma" von der Strahlenresistenz des malignen Melanoms zu überprüfen, wurde als Modell für das menschliche Melanom das Melanom des Goldhamsters benutzt.

Die Methode der quantitativen Transplantation nach HEWITT bietet die Möglichkeit, die zelluläre Strahlenempfindlichkeit solider Tumoren im Tierexperiment quantitativ zu erfassen. Es wurde daher versucht, diese Methode zur Bestimmung der Strahlenempfindlichkeit von malignen Melanomen an Hamstern zu verwenden.

2. Material und Methode

2.1 Tiere

Als Versuchstiere wurden syrische Goldhamster im Alter von drei und sechs Monaten verwendet. Die Hamster wurden von der Firma Bäumler in Wolfratshausen bezogen; später konnte die eigene Zucht der GSF (Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung mbH, München) ausreichend Tiere zur Verfügung stellen.

In verschiedenen Versuchsreihen konnte kein Anhaltspunkt dafür gefunden werden, daß dem Alter und Geschlecht des Spender- oder Empfängertieres besondere Bedeutung für die Versuchsergebnisse zukommt.

Dennoch wurde fast ausschließlich mit weiblichen Hamstern im Alter von drei bis sechs Monaten gearbeitet.

Die Unterbringung und Versorgung der Tiere fand im Kleintierhaus des Instituts für Biologie der GSF in München statt. Die Tiere wurden einzeln in Makrolonkäfigen gehalten. Als Nahrung diente Standardfutter Altromin und Wasser ad libitum.

2.2 Tumor

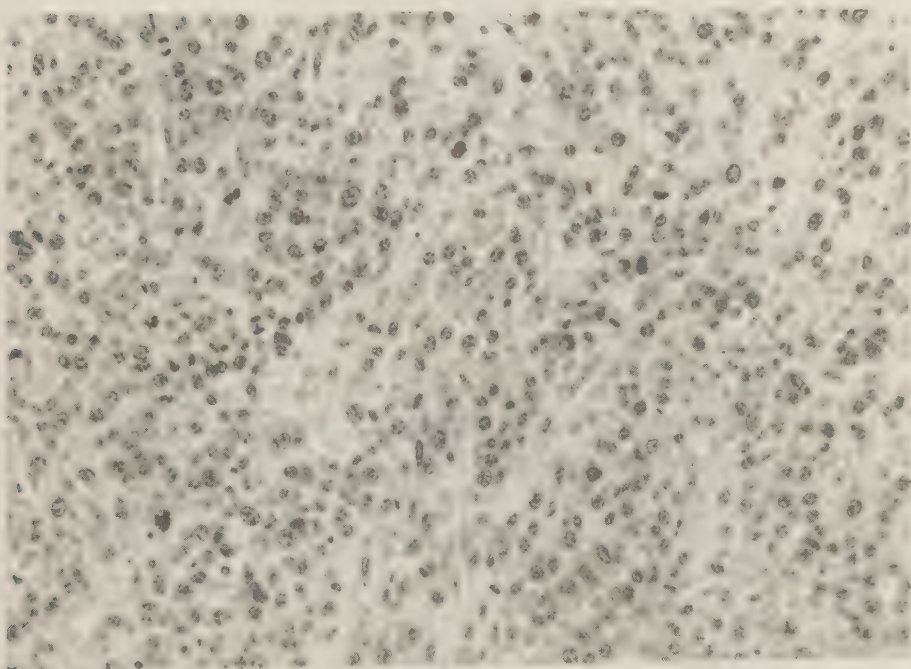
Es wurde mit dem nicht Melanin bildenden Melanom des Hamsters A MEL 3 von Fortner (1957) gearbeitet. Dieser Tumor kann mit dem menschlichen Melanom gut verglichen werden (WOLFF, BALDA et al.).

Lichtmikroskopisch fällt bei dem Melanom des Hamsters die außerordentliche Polymorphie auf, diese bezieht sich auf Größe, Form, Dichte und Struktur der Zellen und insbesondere der Zellkerne.

Das infiltrative Wachstum in das umgebende Bindegewebe gehört zu den weiteren Kennzeichen dieses Tumors. Mit zunehmendem Alter finden sich umschriebene Nekroseherde in den einzelnen Tumorgebieten.

(Weiterführende, auch elektronenmikroskopische Darstellung bei WOLFF, BALDA, BIRKMAYER, BRAUN-FALCO (1971))

Histologisches Bild:



2.3 Transplantation

Zur Erhaltung des Tumormaterials wurde der Tumor in etwa achttägigem Rhythmus bei einer Größe von 10 - 16 mm $\emptyset$, wie sie im Mittel am 7. - 9. Tag nach Transplantation erreicht wird, passagiert. Nach Töten der Tiere mit Chloroform wurde der Tumor unter sterilen Bedingungen entnommen und in stecknadelkopfgroße Stücke zerteilt.

Mit einer Pinzette wurde ein Tumorstück in einen Trokar ($\emptyset$ 2,5 mm) geschoben. Eine mit isotoner NaCl-Lösung gefüllte Spritze wurde dem Trokar aufgesetzt.

Ein Hamster wurde mit Diäthyläther narkotisiert; anschließend wurde ein Hautareal nahe der rechten Schulter rasiert. Die Haut wurde mit 70 % Alkohol desinfiziert.

Ein kleiner Schnitt im kaudalen Teil des rasierten Hautfeldes erleichterte das Einführen des Trokars. Der Trokar wurde subcutan in kranialer Richtung vorgeschoben und leicht hin- und herbewegt, um kleinere Hämorrhagien zu erzeugen. Ein Durchspülen des Trokars mittels der angeschlossenen Spritze garantierte, dass das Tumorstückchen subcutan deponiert war.

2.4 Herstellung der Zellsuspension

Der tumortragende Hamster wurde mit Chloroform getötet. Nach der Präparation des Tumors mit sterilen Instrumenten wurde das Melanom mit einem Skalpell grob zerkleinert. Zur Weiterverwendung wurden die Tumorstückchen in ein

im Eisbad stehendes, mit 5 ml PBS (phosphate buffered saline) vorbereitetes Reagenzglas gefüllt. (Zusammensetzung von PBS: 2,192 g Na_2HPO_4 ; 0,63 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 17,06 g NaCl ad 2000 ml aqua dest.)

Um den Tumor in eine Suspension von Einzelzellen zu verwandeln, wurde ein besonderer Zellhomogenisator ausfindig gemacht, welcher trotz der mechanischen Belastung eine große Anzahl von aktiven Zellen lieferte.

Bei mehreren Vorversuchen hatte sich das Gerät Ultra-Turax besonders bewährt. Der Anteil vitaler Zellen im Eosin-Ausschlußtest (s. u.) war dabei mit geringer Streuung weitgehend konstant.

An diesem Gerät wurde die Einstellung 5 benutzt und die Zerkleinerung des Tumors in eine Suspension von Einzelzellen durch eine manuelle Auf- und Abwärtsbewegung des Reagenzglases unterstützt.

Die Zeitdauer der mechanischen Bearbeitung hing von der Größe und der Konsistenz des Tumors ab. Zum Homogenisieren wurden zwischen 15 und 20 sec benötigt.

Der Zellbrei wurde durch ein Netz gefiltert, um die größeren Partikel zurückzuhalten. Als Netzmaterial bewährte sich besonders das Gewebe von Nylonstrümpfen.

0,5 ml dieser Zellsuspension wurden mit 4,5 ml PBS verdünnt. Dann wurden 0,5 ml entnommen und mit 0,5 ml Eosin-Lösung (0,2 %) gemischt. Nach sorgfältigem Durchmischen und einer Einwirkzeit von etwa zwei Minuten wurde in einer Bürker-Zählkammer die Konzentration der Zellen und der Anteil der vitalen, d. h. ungefärbten Zellen bestimmt. Bei diesen Zellen war die Zellmembran unverletzt geblieben, deshalb konnten diese zumeist runden Zellen auch morphologisch von den eher polymorphen, gefärbten Zellen unterschieden werden.

Der Anteil der runden und ungefärbten Zellen schwankte zwischen 3 % und 7 % der Gesamtzellzahl mit einem Durchschnittswert von 4,5 %.

Von der originalen Zellsuspension wurden mit PBS Serienverdünnungen hergestellt, um die gewünschte Konzentration zu erreichen. Das injizierte Volumen betrug stets 0,5 ml. Die Hamster wurden wie vorher beschrieben narkotisiert. Eine Injektionsnadel (No. 14) wurde subcutan bis zur rechten Schulter vorgeschoben, leicht hin- und herbewegt, um für die Flüssigkeitsmenge einen ausreichenden Hohlraum zu schaffen und ein Blutkoagulum zu bewirken. Erst dann wurde die Zellsuspension injiziert.

Für jede Konzentration wurden fünf Empfängertiere verwendet.

2.5 Herstellung von Feeder-Zellen

Wie schon in 2.4 beschrieben, wurden Zellsuspensionen hergestellt.

Die Zellen wurden 30 sec in einer ^{60}Co -Strahlenquelle mit einer Dosis von etwa 10.000 rd bestrahlt. Durch diese hohe Dosis wurden alle noch lebenden Zellen mit Sicherheit inaktiviert.

Den aktiven, unbestrahlten Zellsuspensionen wurden verschiedenen hohe Mengen letal bestrahlter Zellen zugemischt (s. Tabelle I, II).

0,5 ml dieser gemischten Zellsuspension wurde den Hamstern injiziert.

2.6 Bestrahlung

Die Spendertiere wurden 10 min vor der Bestrahlung mit Chloroform getötet.

Die Bestrahlung erfolgte mit einer $^{137}\text{Caesium}$ -Strahlenquelle (Siemens Gammatron) bei einer Dosisleistung von 200 R/min im Abstand von 40 cm.

Die Dosierung erfolgte durch die Variation der Expositionszeit.

Die Tiere wurden so gelegt, daß der Tumor im Zentrum des Strahlenbündels lag.

Die für die Feederversuche notwendigen letal bestrahlten Zellen wurden in einem Reagenzglas mit einer ^{60}Co -Strahlenquelle (Gammacell 220) bei einer Dosisleistung von 20.000 R/min bestrahlt.

2.7 Kontrolle

Nach der Transplantation wurden die Tiere zweimal pro Woche untersucht, wobei die Injektionsstelle palpiert und der Zeitpunkt notiert wurde, an dem der Tumor erstmals tastbar war.

Das Wachstum des Melanoms erfolgte recht unterschiedlich. Mit Trokar transplantierte Stückchen erreichten im Mittel nach etwa 10 Tagen eine Größe von 10 mm $\emptyset$. Starke Metastasierung in verschiedene Organe (regionale Lymphknoten, Lunge, Leber, Milz u. a.) setzte dem Leben der Hamster nach ca. vier Wochen ein Ende.

In den Versuchen mit Überimpfung von Zellsuspensionen wurden die Tiere im Durchschnitt zweimal wöchentlich über eine Gesamtdauer von 16 Wochen daraufhin untersucht, ob an der Injektionsstelle ein Tumorwachstum zu beobachten ist. Wenn die Größe des Tumors 20 mm $\emptyset$ überschritt, wurde der Transplantationsversuch als positiv gewertet und das tumortragende Tier getötet.

2.8 Berechnung der Werte

Aus dem Verhältnis der positiven und der negativen Transplantationsergebnisse bei den verschiedenen Verdünnungen wurden nach der Methode von LITCHFIELD und WILCOXON (1949) die TD_{50} und der zugehörige Konfidenzbereich bestimmt. Mit dem Begriff TD_{50} wird im vorliegenden Fall die Zellzahl bezeichnet, die in 50 % der Fälle eine positive Antwort auslöst.

Die oben erwähnte Methode nach LITCHFIELD und WILCOXON ermöglicht die statistische Approximation der Ergebnisse von Titrationsversuchen an eine log-normale Summenkurve und die Berechnung des Medianwertes dieser Kurve und seines 95 % Konfidenzbereiches.

3. Ergebnisse

3.1 Überimpfung unbestrahlter Tumorzellen

In mehreren Vorversuchen konnte die Größenordnung der Zellmengen festgelegt werden, die notwendig waren, um in 50 % der Hamster ein Melanom wachsen zu lassen. Als Beispiel wurde der Versuch vom 8. 2. 1974 benutzt, um die Abhängigkeit der Angehrate von der Zahl der transplantierten Zellen zu verdeutlichen (Tabelle I).

In verschiedenen Wiederholungen dieses Versuches ergaben sich TD_{50} -Werte zwischen 200 und 400 Zellen. Für alle weiteren Berechnungen wird von einem TD_{50} -Wert von 275 Zellen ausgegangen. Das entspricht einer Zahl von 21 im Eosin-Ausschlußtest vitalen Tumorzellen.

(I)

Tabelle zu 3.1

Beispiel zur Ermittlung der TD_{50} unbestrahlter Tumorzellen

Datum	Zellzahl	Zahl der Empfänger	positive Transplantate	Latenzzeit (d)	TD_{50}	Konfidenz- bereich
8.2.1974	100	3	0	-	275	175 - 430
	200	4	1	21		
	400	5	4	21-21-21-21		
	800	4	4	21-21-21-28		
	1600	5	5	21-21-21-21-21		

3,2 TD_{50} Feeder

Die Ergebnisse der Versuche zum "Feeder"-Effekt sind in den Tabellen II und III festgehalten. Eine analoge Berechnung der TD_{50} wie in 3,1 war aufgrund der Ergebnisse nicht möglich.

Die Tabellen zeigen die Abhängigkeit der Angehrate sowohl von der Zahl der unbestrahlten Zellen als auch die Bedeutung der Menge von Feederzellen. Mindestens 100.000 letal bestrahlte Zellen waren notwendig, um eine deutlich bessere Angehrate als bei der Kontrollgruppe zu erzielen.

Das Fehlen jeglicher positiver Transplantate bei dem Versuch vom 3. 10. 1974 läßt einen Rechenfehler bei der Herstellung der Zellsuspension vermuten.

Tabelle zu 3. 2

Zusammenstellung aller Versuche mit "Feeder"-Zellen

Datum	Zellzahl	Zahl der Empfänger	positive Transplantate	Latenzzeit (d)
26. 3. 1974	400 + F.	5	2	21 - 30
F = 500.000 Zellen	200 + F.	5	0	
60 _{Co}	400	5	0	
	200	5	0	
10. 5. 1974	800 + F.	5	5	19 - 19 - 19 - 19 - 19
F = 500.000 Zellen	400 + F.	5	1	26
60 _{Co}	200 + F.	5	0	
	800	5	0	
	400	5	0	
	200	5	0	
10. 6. 1974	800 + F.	5	3	16 - 16 - 23
F = 500.000 Zellen	400 + F.	5	0	
60 _{Co}	200 + F.	5	0	
	800	5	1	16
	400	5	0	
	200	5	0	

(III)

Tabelle zu 3.2

Datum	Zellzahl	Zahl der Empfänger	positive Transplantate	Latenzzeit (d)
3.10.1974	600	5	0	
F = 30 sec	600 + 1.000 F.Z.	5	0	
^{60}Co	600 + 10.000 F.Z.	5	0	
	600 + 100.000 F.Z.	5	0	
	600 + 1.000.000 F.Z.	5	0	
16.10.1974	600	5	1	10
25 min	600 + 10.000 F.Z.	5	0	
5.000 rd CS	600 + 100.000 F.Z.	5	3	16 - 20 ~ 20
	600 + 1.000.000 F.Z.	5	4	14 - 20 ~ 20 ~ 20

3.3 TD_{50} nach Bestrahlung

In den beiden Tabellen IV und V wird die Abhängigkeit der zur positiven Tumortransplantation notwendigen Zellzahl von der Strahlendosis wiedergegeben.

Diese Zellzahl steigt gesetzmäßig mit zunehmender Strahlendosis an. Der Prozentsatz der im Eosin-Ausschlußtest als vital erkannten Zellen zeigte nach Bestrahlung keine signifikanten Veränderungen.

(IV)

Tabelle zu 3.3

Datum	Zellzahl	Zahl der Empfänger	positive Transplantate	Latenzzeit (d)	TD ₅₀	Konfidenzbereich
11.3.1974	320.000	4	4	15-15-15-18	14.000	4.240 -
	160.000	4	4	18-18-22-22		46.200
2.000 rad	80.000	5	5	18-18-18-18-22		
	40.000	5	5	22-22-22-22-25		
	20.000	5	3	22-22-56		
	10.000	5	2	22-41		
9.4.1974	320.000	5	4	23-29-36-43	65.000	27.000 -
2.500 rad	160.000	4	4	29-29-36-50		156.000
	80.000	5	3	36-36-70		
	40.000	5	0			

Tabelle zu 3. 3

Datum	Zellzahl	Zahl der Empfänger	positive Transplantate	Latenzzeit (d)	TD ₅₀	Konfidenz-bereich
9. 4. 1974	80. 000	5	5	13-13-13-13-13	<10. 000	Die erhaltenen Werte erlauben keine Bestimmung der TD ₅₀ , sondern gaben nur Hinweise für eine Begrenzung der Zellzahl nach oben.
1. 000 rad	40. 000	5	5	17-17-17-20-20		
	20. 000	5	5	20-20-20-20-20		
	10. 000	5	5	20-20-20-20-36		
22. 4. 1974	20. 000	4	1	16	< 5. 000	Ebenfalls keine ausreichenden Werte für die Berechnung der TD ₅₀ .
1. 500 rad	10. 000	3	1	23		
	5. 000	4	3	37-43-43		
22. 4. 1974	80. 000	5	3	23-30-37	60. 000	120. 000 -
2. 500 rad	40. 000	5	0			30. 000
	20. 000	5	1	51		
3. 5. 1974	40. 000	5	4	19-33-40-61		
2. 000 rad	20. 000	5	2	26-40	24. 000	13. 700 -
	10. 000	5	0			42. 000

(VI)

Tabelle zu 3.3

Datum	Zellzahl	Zahl der Empfänger	positive Transplantate	Latenzzeit (d)	TD ₅₀	Standardabweichungen
6.6.1974	3.200	5	4	20-20-27-41	1.350	795 -
1.000 rad	1.600	5	4	20-20-27-54		2.300
	800	5	1	34		
	400	5	0			
10.7.1974	8.000	4	4	20-20-20-28	3.200	1.880 -
1.500 rad	4.000	3	2	20-20		5.450
	2.000	5	1	20		

3.4 Dosiseffektkurve

Die Ergebnisse der Versuche, die in Kapitel 3.3 beschrieben wurden (Tabellen IV und V) sind in Tabelle VII nochmals zusammengestellt. In der zweiten Spalte ist der berechnete TD_{50} -Wert mit seinem Konfidenzbereich (dritte Spalte) angegeben. In der Spalte 4 ist der Prozentsatz der Zellen angegeben, die sich unmittelbar nach Herstellung der Zellsuspension mit Eosin nicht anfärbten. Der Prozentsatz verringert sich nur wenig mit zunehmender Strahlendosis.

Die Spalte 5 gibt die Zahl eosin-negativer (vitaler) Zellen an, die bei Übertragung der jeweiligen TD_{50} injiziert wurden.

Die Überlebensraten in Spalte 6 berechnen sich nach dem Verhältnis der TD_{50} (des Kontrollwertes) zu der TD_{50} bei der jeweiligen Strahlendosis.

Die graphische Darstellung der Überlebensraten in Abhängigkeit von der Strahlendosis ergibt im halblogarithmischen Koordinatensystem die in Abb. 1 gezeigte Kurve.

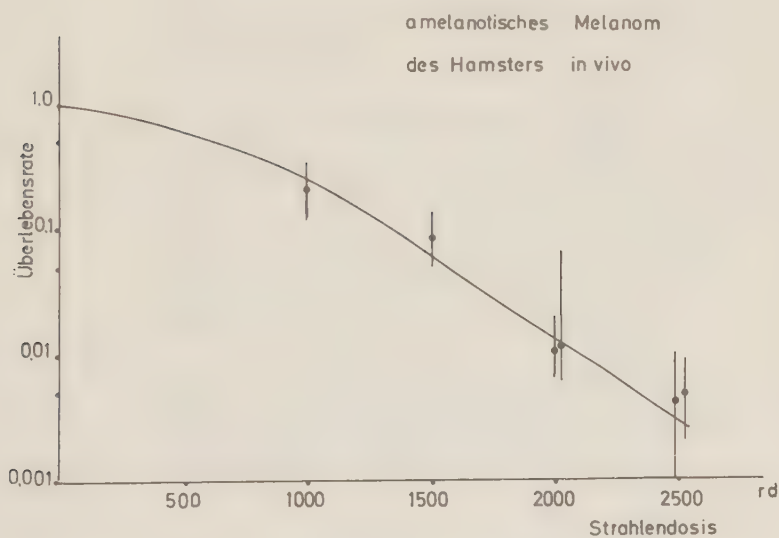


Abb. 1

(VII)
Tabelle zu 3.4

Datum	TD ₅₀	Konfidenzbereich	Anzahl vitaler Zellen %	Anzahl vitaler Zellen absolut	Überlebensrate TD ₅₀ Kontrolle <u>TD₅₀ bestrahlt</u>
28.2.1974 Kontrolle	275	430 - 175	7,8	21	
6.6.1974 1.000 rd	1.350	2.300 - 795	5,1	67	0,2037
10.7.1974 1.500 rd	3.200	5.450 - 1.880	3,3	106	0,0859
3.5.1974 2.000 rd	24.000	42.000 - 13.700	4,6	1.100	0,0114
11.3.1974 2.000 rd	14.000	46.200 - 4.240	6,2	868	0,0196
9.4.1974 2.500 rd	65.000	156.000 - 27.000	2,9	1.880	0,0042
22.4.1974 2.500 rd	60.000	120.000 - 30.000	3,5	2.100	0,0046

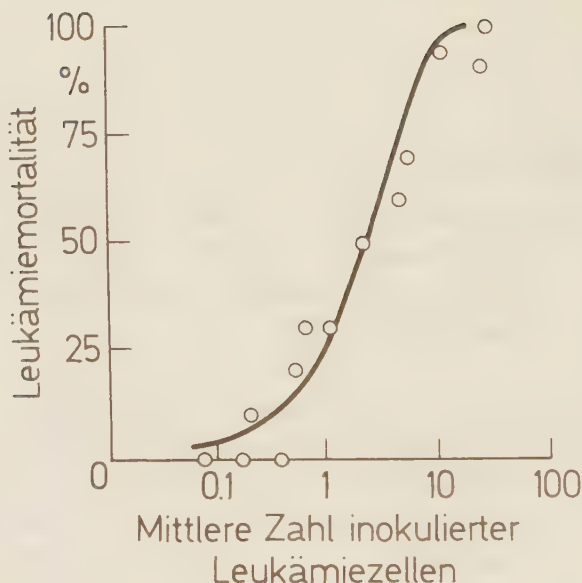
4. Diskussion

4.1 zur Methode

- 4.1.1 HEWITT gelang es im Jahre 1958, die Zellen einer bei CBA-Mäusen auftretenden lymphozytären Leukämie zu isolieren und durch intraperitoneale Injektion zu übertragen.

Durch die Übertragung einer einzelnen Zelle auf Wirtstiere konnte vereinzelt die Leukämie ausgelöst werden. Wurden zwei Zellen injiziert, stieg die Angehrate auf 50 %, bei 10 Zellen auf etwa 75 % der Mäuse. Eine weitere Erhöhung der Zellzahl auf 100 Zellen führte zu einer 100 %-igen Leukämiemortalität.

Die folgende Grafik zeigt die Abhängigkeit der Leukämiemortalität der CBA-Mäuse von der mittleren Zahl geimpfter Leukämiezellen:



Die Leukämiemortalität von CBA-Mäusen in Abhängigkeit von der mittleren Anzahl intraperitoneal injizierter Leukämiezellen (HEWITT, 1958)

Die Zellzahl, die in 50 % der Mäuse eine Leukämie entstehen läßt, wird allgemein als TD_{50} bezeichnet (take dose 50 %). In HEWITT's Experiment waren es zwei Leukämiezellen.

In weiteren Experimenten setzte HEWITT leukämie-
kranke Mäuse einer ^{60}Co -Bestrahlung des ganzen
Körpers mit variierter Dosis aus. Die Mäuse wurden
anschließend getötet; aus der infiltrierten Leber wur-
den Zellsuspensionen hergestellt.

In prinzipiell gleicher Weise wurde bei bestrahlten Spendern die Abhängigkeit der Angehate von der Inokulumgröße bestimmt.

Unbestrahlten CBA-Mäusen wurden unterschiedlich große Mengen bestrahlter Zellen injiziert. Nach einem bestimmten Zeitraum wurde der Prozentsatz der an Leukämie erkrankten Tiere ermittelt und die Zellzahl berechnet, die in 50 % der Tiere Leukämie ausgelöst hatte.

Bildet man nun das Verhältnis der TD_{50} von Leukämiezellen, die aus unbestrahlten Kontrolltieren gewonnen wurden, zu der TD_{50} von Leukämiezellen, die aus einem mit einer bestimmten Dosis vorbestrahlten Tier stammen, so resultiert daraus die Überlebensrate für die betreffende Dosis.

$$\text{Überlebensrate} = \frac{TD_{50} \text{ Kontrollgruppe}}{TD_{50} \text{ bestrahlte Gruppe}}$$

Mit dieser Methode bei entsprechenden Modifikationen wurde später auch die Strahlenempfindlichkeit von Zellen solider Tumoren in vivo getestet.

Die grundlegenden Arbeiten von PUCK und Mitarbeitern in den Jahren 1955/56 ermöglichten es, das Proliferationsvermögen einzelner Zellen in vitro an ihrer Fähigkeit, eine Kolonie zu bilden, zu bestimmen, insbesondere auch dann, wenn diese Zellen Bestrahlungen oder Cytostatika ausgesetzt waren.

Durch die von HEWITT entwickelte Methode ließ sich ein Weg finden, mit verhältnismäßig einfachen Mitteln das Proliferationsvermögen einzelner Tumorzellen in vivo quantitativ zu bestimmen.

Beide Methoden benutzen dabei ein analoges Kriterium. Das Wachstum eines Tumors nach Transplantation von mindestens einer proliferationsfähigen Tumorzelle kann mit der Ausbildung einer Kolonie von 50 - 1000 Zellen *in vitro* verglichen werden.

4.1.2 Feeder

REVESZ (1956) hatte erkannt, daß eine Mischung aus Zellen, die durch eine hohe Strahlendosis getötet worden waren und Zellen, die aktiv und lebensfähig waren, zu einem stärkeren Wachstum des intraperitoneal transplantierten Ehrlich-Aszites-Tumors führten als eine ausschließliche Übertragung von aktiven Zellen.

Die Angehrate überimpfter Tumorzellen kann durch die jeweilige Menge auf das Tier mitüberimpfter toter Zellen beeinflußt werden. Andererseits verschiebt sich mit zunehmender Strahlendosis das Verhältnis von lebenden zu toten Zellen. Deshalb mußte dieser Frage in den Experimenten besondere Aufmerksamkeit geschenkt werden.

PETERS und HEWITT (1974) berichteten, daß bei transplantablen CBA-Mäusen ("NT") die TD_{50} von 2.100 Zellen auf 11 Zellen sank, wenn zugleich 100.000 mit 7.000 rd bestrahlte Zellen injiziert wurden.

Sogar Tumorzellen anderer Mäusestämme bewirkten eine erhebliche Senkung der TD_{50} .

Gehirnextrakte von Mäusen senkten ebenfalls die TD_{50} bei Tumorzellen der Maus.

Diese und weitere Untersuchungen weisen darauf hin, daß der gerinnungsfördernde Effekt der toten Zellmassen für den Feeder-Effekt verantwortlich ist.

PETERS und HEWITT erklären den Effekt so, daß sich ein Fibringitterwerk schützend um die aktiven Tumorzellen aufbaut. Damit wird ein "Abfließen" der Tumorzellen verhindert und so den aktiven Zellen die Möglichkeit zu ungehindertem Wachstum gegeben.

Die Bedeutung dieser Faktoren unterstreicht auch die Tatsache, daß die TD_{50} bei intravenöser Injektion von Tumorzellen um ein Vielfaches höher liegt als bei s.c. Injektion. Die Abwehrkräfte im Immunsystem des Organismus scheinen eher mit den intravasalen als mit den subcutan deponierten Tumorzellen fertig zu werden.

4.2 Sauerstoffeffekt

Die Bedeutung der Sauerstoffkonzentration für die Strahlenempfindlichkeit von Zellen wurde seit den 20-iger Jahren an verschiedenem Untersuchungsmaterial wie tierischen, pflanzlichen Zellen, Bakterien u.ä. beobachtet. (SCHWARZ, 1909; HOLTHUSEN, 1921; GRAY, 1953)

Die Untersuchungsergebnisse zeigten, daß für so verschiedene biologische Effekte wie die Inaktivierung von Zellen, Chromosomenaberrationen oder Strahlentod, unter anoxischen Bedingungen eine doppelt bis dreifach höhere Strahlendosis als unter euoxischen Bedingungen benötigt wird. Dieser generell bestätigte, als Verstärkungsfaktor für die Strahlendosis wirkende Effekt wird als OER (oxygen enhancement ratio) bzw. Sauerstoffverstärkungsfaktor bezeichnet.

Anoxische Bedingungen können auch bei Versuchen in vivo erreicht werden. So wird z. B. eine Extremität abgeklemmt und die Zufuhr von Blut und somit O_2 unterbunden oder das Tier wird getötet.

Das Verhältnis gleichwirksamer Strahlendosen unter euoxischen und anoxischen Bedingungen wurde von verschiedenen Autoren in vivo untersucht und dabei OER-Werte von 2 bis 3 gefunden.

In Vorversuchen wurde für das hier verwendete maligne Melanom festgestellt, daß der Tumor aus ca. 20 % hypoxischen und 80 % euoxischen, proliferationsfähigen Zellen besteht.

Um diese Inhomogenität der Sauerstoffversorgung der Tumorzellen und damit der Strahlenempfindlichkeit auszugleichen und gleiche Ausgangsbedingungen für alle Zellen zu schaffen, wurde der tumortragende Hamster etwa 10 Minuten vor der Bestrahlung getötet. Diese Zeit reicht mit Sicherheit aus, um eine 100 %-ige Anoxie aller Tumorzellen zu erzielen. Die Überlebensfähigkeit der Tumorzellen wird durch die relativ kurze Anoxie nicht nennenswert beeinträchtigt.

4.3 Dosiswirkungsbeziehung im allgemeinen

In der Strahlenbiologie bemüht man sich, die Wirkung von Strahlen auf biologische Objekte, z.B. Viren, Bakterien, Zell- und Gewebekulturen quantitativ zu untersuchen und die Effekthäufigkeit in Abhängigkeit von der Dosis darzustellen.

Bei den Ausführungen über die Theorie der Dosiswirkungsbeziehungen folge ich der Darstellung von HUG (1974).

Der Anteil der noch "intakten Einheiten" oder "Überlebende" wird konventionell mit S bezeichnet.

$$S = \frac{\text{Zahl der "überlebenden Einheiten"}}{\text{Zahl der ursprünglich vorhandenen Einheiten}}$$

Für eine Dosiseffektkurve wird die Zahl der Überlebenden (S) gegen die Dosis aufgetragen. Die experimentell gefundenen Dosiswirkungsbeziehungen weichen immer von einer theoretisch möglichen Stufenfunktion ab. Diese wäre nur dann gegeben, wenn eine strenge Kausalität zwischen Schädigung und Effekt bestünde. Da aber die verschiedenen

natürlichen "Einheiten" in der Biologie unterschiedlich reagieren, wird man immer von der Stufenfunktion abweichende Kurven erhalten.

Die für die Praxis wichtigen Dosiswirkungskurven lassen sich in die sigmoide Dosiswirkungsbeziehung und die exponentielle Dosiswirkungsbeziehung unterteilen.

Bei der Inaktivierung von Enzymen oder Viren findet sich meist eine exponentielle Dosiswirkungsbeziehung. Da diese Kurve asymptotisch gegen 0 verläuft, besteht selbst bei hohen Dosen die Wahrscheinlichkeit, daß einzelne Einheiten überleben. Die mathematische Formel dafür lautet:

$$S(D) = e^{-RD}$$

R bezeichnet eine Konstante (Reaktivität)

e die Basis des natürlichen Logarithmus

Säugetierzellen im allgemeinen und auch die Dosiseffektkurven des malignen Melanoms in vitro und in vivo weisen eine asymmetrische sigmoide Dosiseffektkurve auf, die sich in halblogarithmischer Darstellung als Schulterkurve darstellt.

Die Treffertheorie (DESSAUER, 1964) versuchte, diese asymmetrische sigmoide Kurvenform damit zu erklären, daß bei der "quantenhaften Natur der Energiedeposition" entweder mehrere Treffer in einem empfindlichen Bereich erfolgen müssen oder daß mehrere empfindliche Bereiche eine bestimmte Anzahl von Treffern erhalten haben müssen.

Während bei Vorliegen einer exponentiellen Kurve die Reaktivität (R) -sie entspricht bei halblogarithmischer Darstellung der Neigung der Dosiseffektkurve bei der jeweiligen Dosis- unabhängig von der Dosis oder der Zahl der bereits inaktivierten Zellen ist, d.h. konstant ist, steigt bei sigmoiden Kurven die Reaktivität mit zunehmender Dosis an.

Die sigmoide Kurve zeigt an, daß bei niedrigen Dosen die Zellen eine gewisse Kompensationsfähigkeit besitzen, die bei steigender Dosis abnimmt. Die Reaktivität (R) nimmt dementsprechend zu und nähert sich meist bei höheren Dosen einem Endwert.

Die Dosisabhängigkeit des Überlebens menschlicher und tierischer Zellen im Koloniebildungstest in vitro oder im quantitativen Transplantationsversuch folgt im allgemeinen einer Schulterkurve (Übersicht: TROTT (1972), HUG (1974)).

Die Dosiseffektkurven werden durch verschiedene Parameter beschrieben:

- a) Die (D_0) gibt die Dosis an, welche die Zahl der Überlebenden im exponentiell verlaufenden Teil der Dosis-effektkurve auf $1 / e \approx 37 \%$ vermindert.
- b) Die Extrapolationsnummer (n) ermittelt man dadurch, daß man den geradlinigen Verlauf der Kurve in halblogarithmischem Maßstab zur Ordinate hin verlängert. Der Schnittpunkt mit der Ordinate ergibt den Wert der Extrapolationsnummer.

- c) Aus den asymmetrischen sigmoiden Dosiswirkungskurven lassen sich auch der Mittelwert $\bar{D}$ der Inaktivierungsdosis und deren mittlere Streuung σ bestimmen.
- d) Die relative Steilheit σ , die nach der von HUG und KELLERER (1966) angegebenen Methode berechnet wurde, ist ein Maß für die Rolle von Zufallsfaktoren bei der Strahlenwirkung.

Für das maligne Melanom des Hamsters wurden die verschiedenen Parameter der Dosenwirkungskurven *in vivo* und *in vitro* bestimmt. Die Werte sind in Tabelle (VIII) zusammengestellt.

(VIII)

Tabelle zu 4.3

Parameter der Dosiswirkungsbeziehung

für das maligne Melanom des Hamsters

	<u>in vivo</u>	<u>in vitro</u> (s. 4.5)
mittlere Inaktiverungsdosis ($\bar{D}$) (Reaktivität)	786 rd	386 rd
Varianz der Inaktivierungsdosis ($\text{rd})^2$ σ^2	205027	86178
relative Steilheit σ	3,0	1,73
D_0	320	145
D_{37}	850	410
n	5	16

4.4 Vergleich mit anderen Tumoren

In den letzten Jahren wurde die zelluläre Strahlenempfindlichkeit mehrerer Tiertumoren untersucht, indem die Tiere bestrahlt und die Überlebensraten der Tumorzellen durch quantitative Transplantation festgestellt wurden.

An einigen Beispielen sollen die Ergebnisse dieser Arbeiten durch die angegebenen Parameter der ermittelten Dosis-effektkurven wiedergegeben werden.

HEWITT und WILSON (1959) bestrahlten CBA-Mäuse, die eine lymphocytäre Leukämie hatten, mit einer ^{60}Co -Gammastrahlenquelle. Für die beiden Parameter der Dosiseffektkurve, die D_0 und die Extrapolationsnummer, geben sie an:

$$\begin{aligned} D_0 &= 162 \text{ rd} \\ n &= 2 \end{aligned}$$

Für Versuche an Mäusen von BERRY und ANDREWS (1961) mit der P-388 lymphocytären Leukämie (Strahlenart: 3 MeV-Röntgenstrahlen) wurden folgende Werte veröffentlicht:

$$\begin{aligned} D_0 &= 160 \text{ rd} \\ n &= 1,6 \end{aligned}$$

Eine andere Leukämieart, als AKR/J-Lymphom beschrieben, benutzten BUSH und BRUCE (1965). Strahlenart: ^{60}Co -Gammastrahlen. Die Dosiseffektkurve wurde beschrieben durch:

$$\begin{aligned} D_0 &= 133 \text{ rd} \\ n &= 1,9 \end{aligned}$$

Für den Ehrlich-Aszites-Tumor, der in einer diploiden (SILINI und HORNSEY (1962)) und einer tetraploiden (HORNSEY und SILINI (1962)) Form auftritt, wurden bei gleicher Strahlenart (200 kV-Röntgenstrahlen) folgende Kenngrößen ermittelt:

$$\begin{array}{ll} \text{diploid} & D_0 = 109 \text{ rd} \\ & n = 10 \end{array}$$

$$\begin{array}{ll} \text{tetraploid} & D_0 = 114 \text{ rd} \\ & n = 2 \end{array}$$

Eine Arbeit von REINHOLD (1966) berichtete über Versuche an einem transplantablen Rhabdomyosarkom der Ratte. Die für die Überlebenskurve anoxischer Zellen gefundenen Dosis-effektkurvenparameter sind:

$$\begin{array}{ll} D_{37} & = 380 \text{ rd} \\ n & = 10 \end{array}$$

Um anoxische Bedingungen für die Zellen des KHT-Sarkoms bei C 3 H / Km-Mäusen zu erzielen, wurden die Tiere durch Beatmung mit Stickstoff getötet. Van PUTTEN und KALLMAN (1968) ermittelten für die Überlebenskurve folgende Kenngrößen:

$$\begin{array}{ll} D_0 & = 357 \text{ rd} \\ n & = 2,7 \end{array}$$

Die Zusammenstellung der Überlebensraten verschiedener Mäusetumorzellen nach Bestrahlung unter hypoxischen und euoxischen Bedingungen veröffentlichte BERRY (1971); alle Werte wurden mit der Transplantationsmethode erhalten.

Die eigenen Werte passen sehr gut in die durch die ausgefüllten Symbole bestimmte Dosiseffektkurve hypoxischer Tumorzellen verschiedenster Herkunft.

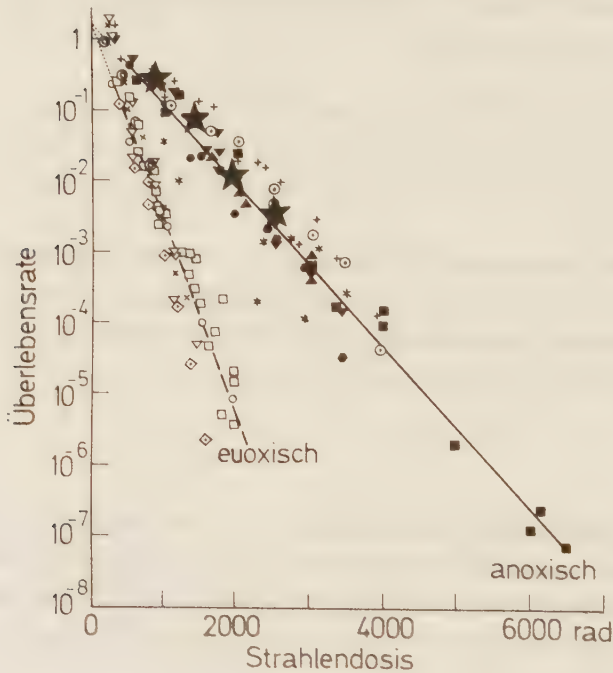


Abb. 2. Das Überleben der Vermehrungsfähigkeit verschiedener Mäusetumorzellen in vivo nach Bestrahlung, zusammengestellt von R.J. BERRY (1971). In diese Kurve sind die Punkte von Abb. 1 mit großen Sternen eingetragen.

4.5 Vergleich mit in vitro

Zum Vergleich wurde die Dosiseffektkurve der Tumorzellen des malignen Melanoms des Hamsters in vitro herangezogen (unveröffentlichte Daten von TROTT et al.).

Es wurde eine Primärkultur angelegt und über viele Passagen weitergezüchtet. Die Proliferationsfähigkeit einzelner Tumorzellen wurde nach der von PUCK und Mitarbeitern entwickelten Methode quantitativ bestimmt. Die Kolonieausbeute lag bei unbestrahlten Kontrollen bei 100 %. Bei den Kulturen, die bestrahlt worden waren, nahm sowohl die Zahl als auch die Größe der Kolonie mit steigender Dosis ab.

Um die beiden Dosiseffektkurven des malignen Melanoms des Hamsters in vivo und in vitro miteinander vergleichen zu können, wurde untersucht, ob in vitro noch die originalen Tumorzellen enthalten waren. Es wurden Zellen der Kultur entnommen und diese jungen Hamstern injiziert. Das histologische Bild der dabei entstandenen Tumoren entsprach dem Bild der Tumoren, die in üblicher Weise passagiert worden waren.

Ein Vergleich der vorliegenden Kurven nach Bestrahlung in Kultur bzw. im Tier zeigt, daß beide Kurven unter Berücksichtigung eines Sauerstoffstärkungsfaktors von etwa 2,3 innerhalb der Standardabweichung der einzelnen Versuchspunkte zur Deckung gebracht werden können, d.h. sie sind nicht signifikant verschieden.

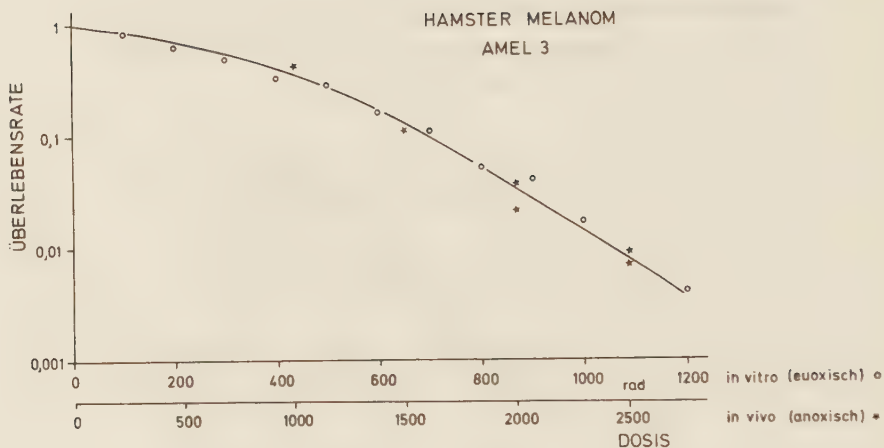


Abb. 3. Vergleich der Dosiseffektkurven des Melanoms des Hamsters in vivo und in vitro.

4.6 Bedeutung für die Praxis

Die Therapie maligner Tumoren durch Bestrahlung oder Cytostatika beruht vor allem darauf, daß das Proliferationsvermögen der Tumorzellen irreversibel blockiert wird. Somit hängt die Strahlenempfindlichkeit eines Tumors in erster Linie von der Dosiswirkungsbeziehung der Zellinaktivierung der jeweiligen Tumorzellen ab.

Am Modell des Hamstermelanoms wurde das alte Dogma von der besonderen Strahlenresistenz des malignen Melanoms schlechthin untersucht. Diese alte These konnte für die Hamstermelanomzellen nicht bestätigt werden.

Wenn auch auf den Modellcharakter der Experimente besonders hingewiesen werden muß, so deckt sich diese Erkenntnis doch mit neueren klinischen und experimentellen Befunden (SKOPAL, Dissert. (1974); BARRANCO (1971)), welche die gängige Lehrmeinung der geringen Strahlenempfindlichkeit der Melanomzellen und der Melanome anzuzweifeln nötigen.

Verstärkte Zusammenarbeit von Dermatologen, Strahlenbiologen und Strahlentherapeuten könnte Fortschritte in der Therapie des malignen Melanoms bringen und zu einer gezielten Kombination der strahlentherapeutischen und operativen Behandlungsmethoden führen.

5. Zusammenfassung

Mit der von HEWITT aufgestellten Methode der quantitativen Transplantation von Tumorzellen wurden die Überlebensraten für das maligne Melanom (A MEL 3 von FORTNER) des syrischen Goldhamsters ermittelt.

Die TD_{50} unbestrahlter Zellen betrug zwischen 200 und 400 Zellen. Die Tiere wurden nach Tötung mit Strahlendosen zwischen 1.000 und 2.500 rd bestrahlt. Die TD_{50} stieg an und lag bei der höchsten Strahlendosis bei etwa 60.000 Zellen.

Die daraus ermittelte Dosiswirkungsbeziehung der hypoxischen Tumorzellen war charakterisiert durch eine D_0 von 320 rd und eine Extrapolationsnummer $(n) = 5$.

Somit weicht die Strahlenempfindlichkeit des malignen Melanoms des Hamsters nicht signifikant von der anderer Nagertumoren ab.

Diese Ergebnisse ermutigen dazu, die radiologische Behandlung des malignen Melanoms auch beim Menschen erneut zu überdenken.

6. Literatur

Barranco, S.C.; M.M. Romsdahl; R.M. Humphrey:

The radiation response of human malignant Melanoma cells grown in vitro.

Cancer Research 31, 850 - 833 (1971)

Berry, R.J.; J.R. Andrews:

Quantitative relationship between radiation dose and the reproductive capacity of tumor cells in a mammalian System in vivo.

Radiology 77 (1961)

Berry, R.J.:

Hypoxic protection and recovery in tumor cells irradiated at low dose-rates and assessed in vivo.

Brit. J. Radiol. 41, 921 - 926 (1968)

Berry, R.J.:

Zelluläre Faktoren der Strahlenempfindlichkeit.

Präoperative Tumorbestrahlung. Hrsg. O. Hug

München: Urban & Schwarzenberg (1971)

Bush, R.S.; Bruce, W.R.:

The radiation sensitivity of a transplanted murine lymphoma as determined by two different assay methods.

Rad. Res. 25, 503 - 513 (1965)

Dewey, D.L.:

Effect of oxygen and nitric oxide in the radiosensitivity of human cells in tissue culture.

Nature 186, 780 - 782 (1960)

Fortner, J.G.:

Spontaneous tumors, including gastrointestinal neoplasms and malignant melanomas, in the Syrian hamster.
Cancer 10, 1153 - 1156 (1957)

Fortner, J.G.:

Hitherto unreported malignant melanomas in the Syrian hamster: an experimental counterpart of human malignant melanoma.
Cancer Res, 28, 98 - 104 (1958)

Gray, L.H.; Conger, A.D.; Ebert, M.; Hornsey, S.;
Scott, D.C.A.:

The concentration of oxygen dissolved in tissues at the time of irradiation as a factor in a radiotherapy.
Brit. J. Radiol. 26, 638 - 648 (1953)

Hewitt, H.B.:

Studies of the dissemination and quantitative transplantation of a lymphocytic leukaemia of CBA-mice.
Brit. J. Cancer 12, 378 - 401 (1958)

Hewitt, H.B.; Wilson, C.W.:

A survival curve for mammalian leukaemia cells irradiated in vivo (implications for the treatment of mouse leukaemia by whole-body irradiation).
Brit. J. Cancer 13, 69 - 75 (1959)

Hewitt, H.B.; Chan, D.P.-S.; Blake, E.R.:

Survival curves for clonogenic cells of a murine heratinizing squamous carcinoma irradiated in vivo or under hypoxic conditions.
Int. J. Rad. Biol. 12, 535 - 549 (1967)

Holthusen, M.:

Beiträge zur Biologie der Strahlenwirkung. Untersuchungen
an Askarideneiern.

Pflügers Arch. ges. Physiol. 187, 1 - 24 (1921)

Hornsey, S.; Silini, G.:

Studies on cell survival of irradiated Ehrlich-Aszites
tumour II. Dose-effect curves for x-rays and neutron
irradiations.

Int. J. Rad. Biol. 4, 135 - 141 (1961)

Hug, O.; Kellerer, A.:

Zur Interpretation der Dosiswirkungsbeziehung in der
Strahlenbiologie.

Biophysik 1, 20 - 32 (1963)

Hug, O.; Kellerer, A.:

Stochastik der Strahlenwirkung.

Berlin, Springer (1966)

Hug, O.:

Medizinische Strahlenkunde.

Berlin - Heidelberg - New York, Springer (1974)

Litchfield, J. T. (jr); F. Wilcoxon:

A simplified method of evaluating dose-effect experiments.

J. Pharmacol. exp. Ther. 96, 99 - 113 (1949)

Marcus, P. J.; Ciecura, S. J.; Puck, T. T.:

Clonal growth in vitro of epithelial cells from normal
human tissues.

J. Exp. Med. 104, 615 - 627 (1956)

Peters, L. J. ; H. B. Hewitt:

The influence of fibrin formation on the transplantability of murine tumour cells: implications for the mechanism of the Révész effect.

Brit. J. Cancer 29, 279 - 291 (1974)

Puck, T. T. ; Marcus, P. J. :

A rapid method for viable cell titration and clone production with He La cells in tissue culture: the effect of x-irradiated cells to supply conditioning factor.

Proc. Natl. Acad. Sci. 41, 432 - 437 (1955)

van Putten, L. M. ; Kallman, R. F. :

Oxygenation status of a transplantable tumor during fractionated radiation therapy.

J. Natl. Canc. Inst. 40, 441 - 451 (1968)

Reinhold, H. S. :

Quantitative evaluation of the radiosensitivity of cells of a transplantable Rhabdomyosarcoma in the rat.

Europ. J. Cancer 2, 33 - 42 (1966)

Révész, L. :

Effect of tumour cells killed by x-rays upon the growth of admixed viable cells.

Nature 178, 1391 (1956)

Schwarz, G. :

Über Dosensibilisierung gegen Röntgen- und Radiumstrahlen.
München. Med. Wschr. 56, 1217 - 1218 (1909)

Silini, G.; Hornsey, S.:

Studies on cell-survival of irradiated Ehrlich-Aszites tumour I. The effect of the Host's age and the presence of non viable cells on tumour takes.

Int. J. Radiat. Biol. 4, 127 - 134 (1961)

Silini, G.; Hornsey, S.:

Studies on cell-survival of irradiated Ehrlich aszites tumour III. A comparison of the x-ray survival curves obtained with a diploid and a tetraploid strain.

Int. J. Radiat. Biol. 5, 147 - 153 (1962)

Skopal, D.

Strahlentherapie des Malignen Melanoms.

Dissert., Medizinische Fakultät der Univ., München, 1974

Trott, K.R.:

Strahlenwirkung auf die Vermehrung von Säugetierzellen
in: Handbuch der Med. Radiologie, Bd. II/3

Hrsg. O. Hug u. A. Zuppinger

Berlin - Heidelberg - New York (1972)

Wolff, H.H.; B.R. Balda; G.D. Birkmayer u.

O. Braun-Falco:

Zur Ultrastruktur des Hamster-Melanoms A MEL 3 von
Fortner.

Arch. Derm. Fortschr. 240, 192 - 203 (1971)

Für die Überlassung des Themas möchte ich Herrn
Prof. Dr. O. Hug herzlichst danken.

Herrn Priv. Doz. Dr. K.-R. Trott habe ich für die intensive Betreuung bei der Gestaltung dieser Arbeit ganz besonders Dank zu sagen.

Für wertvolle Ratschläge danke ich Herrn Dr. Kummermehr.

Von den Mitarbeitern des Instituts für Strahlenbiologie möchte ich vor allem Fräulein Schneider für ihren technischen Beistand bei der Entstehung der Arbeit dankbar erwähnen.

Der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung mbH, München, danke ich für die Möglichkeit, die vorliegenden Untersuchungen durchzuführen. Die Arbeit wurde zusätzlich durch Mittel aus dem Curt-Bohnewand-Fonds der Medizinischen Fakultät der Universität München gefördert.

LEBENS LAUF

Am 7. Mai 1951 wurde ich als erster Sohn der Eheleute Ellen und Karl-August Engels in Saig (Schwarzwald) geboren.

Mein Vater ist Diplom-Ingenieur der Hüttenkunde; zur Zeit leitet er als Geschäftsführer eine Gießerei in Velbert (Rheinland).

Im gleichen Ort besuchte ich die Volksschule, anschließend das Gymnasium im neusprachlichen Zweig. Im Jahre 1969 beendete das Abitur meine Schulzeit. Nach einem Auslandssemester in Graz setzte ich das Studium der Medizin in München fort.

Die Physikumsprüfung legte ich im Jahre 1972 ab, das Staatsexamen im Jahre 1975.

